



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

**DISTRIBUCIÓN DE LOS DOMINIOS DE MEMBRANA POR DAÑO
EN LA TECA PERINUCLEAR EN EL SEMEN CRIOPRESERVADO
DE CERDO.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

YESCAS ZAPATA DANIA

TUTOR:

Dra. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

COMITE TUTORAL:

Dra. MARIA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

Dr. DANIEL MOTA ROJAS.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
Índice de figuras y tablas.....	II
Resumen.....	III
Abstract.....	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. HIPÓTESIS.....	16
IV. OBJETIVOS.....	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
VI. RESULTADOS.....	24
VII. DISCUSIÓN.....	30
VIII. CONCLUSIONES.....	33
IX. LITERATURA CITADA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Composición de la membrana plasmática.	3
Figura 2. Representación esquemática del anclaje de proteínas transmembrana	4
Figura 3. Esquema de los mecanismos propuestos que restringen la movilidad lateral de las proteínas de la membrana plasmática.	5
Figura 4. Microscopia de fluorescencia mostrando la nomenclatura y morfología de los subdominios de la membrana plasmática de la cabeza de espermatozoides de cerdo	7
Figura 5. Morfología de la subestructura de la TP de espermatozoides de cerdo.	14
Figura 6. Clasificación de los patrones de las células espermáticas teñidas por la Técnica de Triple Tinción	21
Figura 7. Microscopia de fluorescencia mostrando los distintos patrones encontrados en la membrana plasmática con la lectina Con-A en los espermatozoides frescos y descongelados.	25
Figura 8. Microscopia de fluorescencia mostrando los distintos patrones encontrados en la membrana plasmática con la lectina WGA de los espermatozoides frescos y descongelados con lectina WGA unida a un fluorocromo.	26
Figura 9. Microfotografías de cabezas espermáticas mostrando la integridad de la TP ...	27
Grafica 1. Comparación entre el porcentaje de la integridad morfológica de la subestructura de la teca perinuclear en los espermatozoides frescos y descongelados.	28
Tabla 1. Lectinas mayormente usadas en pruebas histoquímicas.	8
Tabla 2. Evaluación de la integridad del acrosoma y la viabilidad espermática en semen fresco y descongelado	24
Tabla 3. Coeficientes de correlación de spearman entre la integridad de la subestructura de la teca perinuclear y los patrones de los dominios de membrana en espermatozoides frescos y descongelados con las lectinas Wga y Con-A en espermatozoides y descongelados.	29

Resumen

Durante la congelación y descongelación las células espermáticas sufren alteraciones diferentes lugares de la célula como es en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide la cual a su vez presenta tres dominios involucrados en la capacidad fertilizante del espermatozoide los cuales cubren la cabeza, el primero es el dominio que se encuentra localizados en la región anterior de la cabeza, el cual participa en la reacción acrosomal, mientras que los que se localizan en el segmento ecuatorial y de la región postacrosomal, se consideran responsables de la fusión del espermatozoide con el ovocito. La Teca Perinuclear (TP), es el principal elemento citoesquelético de la cabeza de los espermatozoides de mamíferos ha sido involucrada en el mantenimiento de los dominios de la membrana plasmática. Experimentalmente, los dominios son evidenciados por el uso de lectinas específicas. El objetivo de este estudio, es investigar si después del proceso de congelación y descongelación del semen de cerdo, la TP sufre desestabilización, lo cual puede provoca alteraciones en los dominios de membrana de la cabeza espermática. Para dicha evaluación, se emplearon las siguientes lectinas: WGA y Con-A marcada con fluoresceína, y se encontró la redistribución de los dominios durante el proceso de congelado/ descongelado; en semen fresco la lectina CON-A, marco el dominio de la región apical y en semen descongelado esta distribución se encontró en la región postacrosomal. En células espermáticas teñidas con la lectina WGA se tiño en la región acrosomal de los espermatozoides frescos disminuyendo esta marca en gran porcentaje en espermatozoides descongelados predominando la fluorescencia en la región ecuatorial. Para valorar el estado de la TP se empleó como marcador morfológico la integridad de la subestructura, encontrando una diferencia significativa en la integridad de la TP de espermatozoides frescos y descongelados ($P < 0.05$). En la determinación del estado fisiológico, la integridad de la membrana, así como para evaluar viabilidad de células espermáticas, se empleo la técnica de Triple tinción.

Palabras claves: Dominios de membrana, Teca Perinuclear, espermatozoides.

Abstract

During the freezing and post-thawet the spermatic cells suffer different alteration in different places, as in the plasmatic membrane of the head, the one which sperm at the same time presents three domains involved in the fertilizing capacity of the those which sperm cover the head, the first is the domain that is found located in the anterior region of the head, which participates in the acrosomal reaction, while those which are located in the equatorial segment of the region postacrosomal, which is considered responsible for the fusion of the sperm with the oocyte. The Perinuclear Theca (PT), it is the principal cytoskeletal element of the head of the mammal sperms and has been involved in the maintenance of the domains of the plasmatic membrane. Experimentaly, the domains are evidenced by the use of specific lectins. The aim of this paper, was to investigate if after of the freezing and post-thawet process of the boar semen, the PT underwent desestabilization, something which can provokes alterations in the membrane domains of the spermatic head. For such evaluation, we employed the following lectinas: WGA and Con-A labeled with FITC-fluorescein, and was found the redistribution of the domains during the process of thawed/post-thawed; in fresh semen the lectin with Con-A, pointed the domain of the apical region and in post-thawed semen, this distribution was found in the postacrosomal region. In spermatic cells dyed with the lectin WGA this pointed the acrosomal region of the fresh sperms heads reducing this mark in great percentage in post-thawed sperms, prevailing the fluorescence in the equatorial segment. To value the state of the PT, was employed as morphological marker the integrity of the subestructure, finding a meaningful difference in the integrity of the PT of fresh and post-thawed sperms ($P < 0.05$). In the determination of the physiological state, the integrity of the membrane, as well as to evaluate spermatic cells viability, is employment the triple stain technique.

Key words: Membrane domains, Perinuclear Teca, sperms.

I. INTRODUCCION

La criopreservación de semen y su utilización en la inseminación artificial ha causado impacto en la reproducción animal. La congelación de las células tiene el objetivo de preservarlas a bajas temperaturas reduciendo su metabolismo, a -196° C. Mediante la criopreservación del semen es posible conservarlo potencialmente fértil desde la eyaculación hasta la fecundación (MC Stornelli 2005). Sin embargo, durante el proceso de congelación/descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de los espermatozoides. Esta reducción de la fertilidad se relaciona tanto con la muerte de las células que no soportan el daño del proceso de congelación y descongelación, como con la presencia de daño no letal en la población de espermatozoides sobrevivientes. A este último, Crister (citado por Stornelli, 1987) observó que los espermatozoides descongelados motiles, con membranas intactas no mantienen la viabilidad y capacidad fecundante por el mismo tiempo que los espermatozoides frescos. Entre otros aspectos, la reducción de la fertilidad asociada al semen congelado ha sido atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (Stornelli, 1987). Otra estructura espermática que es sensible al proceso de criopreservación es la teca perinuclear, principal citoesqueleto de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos, la cual ha sido relacionada con el mantenimiento de los dominios de la membrana plasmática (Bhur 1991). Durante el proceso de criopreservación se producen alteraciones de los dominios presentes en la membrana de la cabeza espermática de cerdo (James 1999), los cambios son semejantes a los que experimenta de manera fisiológica el espermatozoide durante la capacitación.

II. ANTECEDENTES.

Membrana plasmática.

La membrana plasmática es una estructura laminar que encierra a la célula, define sus límites y mantiene las diferencias esenciales entre el citosol y el ambiente extracelular. Esta se encuentra formada por lípidos, proteínas y carbohidratos. La bicapa lipídica es la estructura básica de la membrana plasmática y sirve como una barrera selectiva para el paso de moléculas; las proteínas realizan las diversas funciones de la membrana. Es una estructura asimétrica, lo cual significa que la composición de lípidos, proteínas y carbohidratos de las dos monocapas difieren una de la otra. Por ejemplo, la fosfatidilcolina y la esfingomiélinina predominan en la monocapa externa, mientras que los glucolípidos son exclusivos de la misma, por otra parte la fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, lo hacen en la monocapa interna. Además, es una estructura dinámica y fluida, es decir sus moléculas presentan libertad de movimiento. Los lípidos poseen movimiento de rotación, movimientos de difusión lateral, así como movimientos de flip-flop, en este último los lípidos pueden pasar de una monocapa a otra, gracias a la actividad enzimática, por lo que son movimientos poco frecuentes. Además la fluidez de la membrana depende de factores como: la temperatura y la composición de los ácidos grasos (Figura 1).

Adicionalmente contiene moléculas de colesterol que se intercalan entre los fosfolípidos, confiriéndole mayor estabilidad a las membranas aunque disminuyen su fluidez (Córdova, 2003)

Entre las funciones que cumple la membrana se encuentran las siguientes:

Proteger a la célula.

Regular el transporte de moléculas.

Recibir y transmitir señales.

Reconocimiento celular.

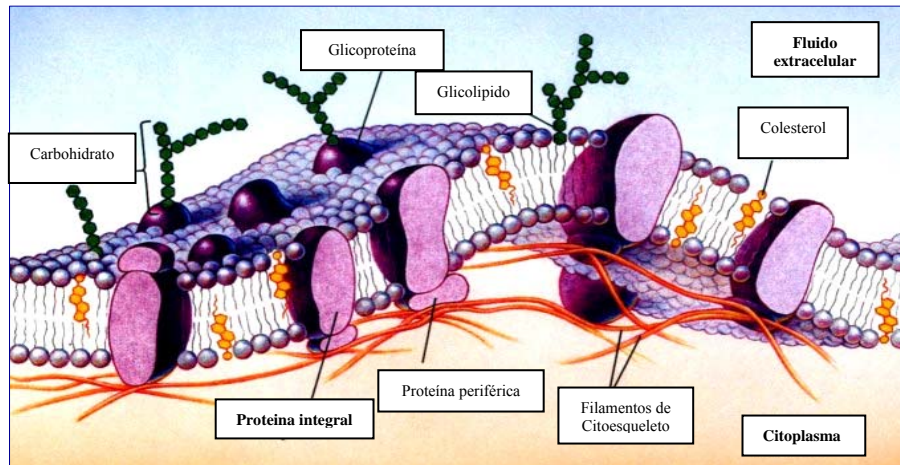
Anclaje para el citoesqueleto o componentes de la matriz extracelular.

Permitir la formación de dominios para funciones específicas.

Cabe mencionar que en varios tipos de células muchas de las funciones de la membrana plasmática dependen directamente de la formación de dominios, por lo que

resulta crítico entender tanto el mantenimiento como composición de estos (Lommerse, Spaik., Schmildt T. 2004)

En el caso del espermatozoide de los mamíferos los dominios de la membrana juegan un papel crítico en todas las funciones de la célula, por lo tanto su mantenimiento es esencial ya que cada uno juega un papel específico en la fertilización (Parks y Gram. 1992)



Fuente: Holt 1995.

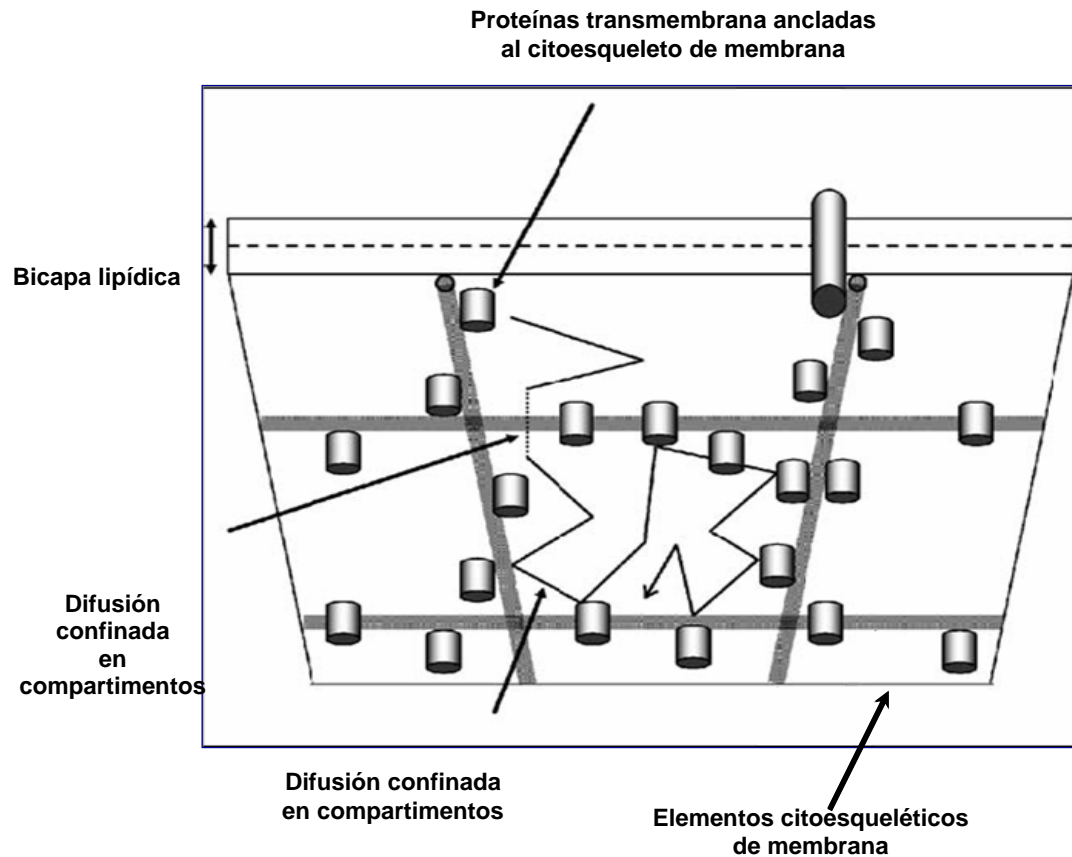
Figura 1. Composición de la membrana plasmática.

DOMINIOS DE MEMBRANA

El modelo del mosaico fluido de las membranas biológicas presume una distribución homogénea de lípidos y proteínas en el plano de la bicapa. Sin embargo, la movilidad de sus moléculas puede estar restringida a ciertas áreas, es claro que existen dominios o regiones dentro de algunas membranas que están separadas físicamente uno del otro o otras porciones de la membrana (Figura 2). Estos tienen una composición diferente y despliegan funciones específicas. Los dominios son mantenidos por (Figura 3):

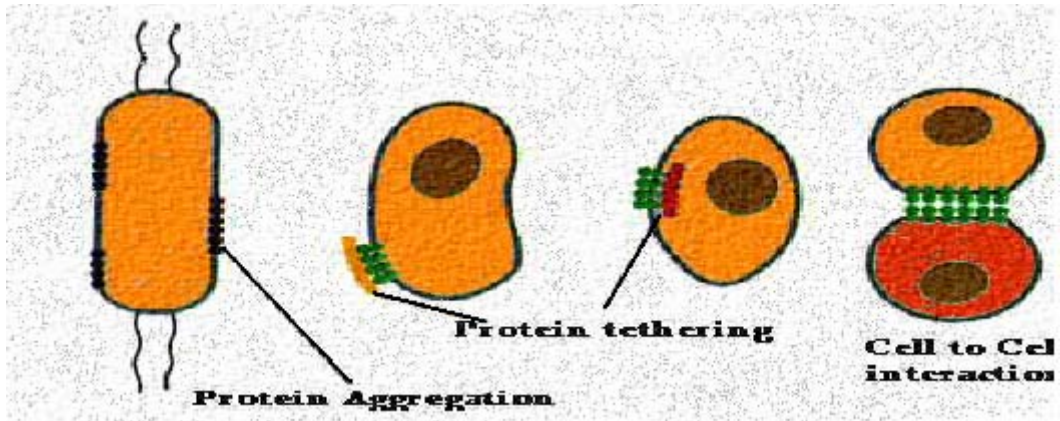
- La agregación de proteínas y lípidos en el plano de la membrana.
- Interacción con la matriz extracelular.

- Interacciones con elementos del citoesqueleto.
- Interacciones específicas proteína-proteína entre membranas.
- Estructuras específicas en la membrana (Cowan, 2001).



Fuente: Lommerse P.H.M, Spaik H.P., Schmidt T. 2004

Figura 2. Representación esquemática del anclaje de proteínas transmembrana, ancladas a la membrana asociadas al citoesqueleto confinando el movimiento de proteínas y lípidos. El dibujo despliega una vista desde la cara citoplásmica.



Fuente: Alberts 2002.

Figura 3. Esquema de los mecanismos propuestos que restringen la movilidad lateral de las proteínas de la membrana plasmática.

Se han reconocido cuatro diferentes categorías de dominios de membrana (Burn, 1992):

- 1) Dominios macroscópicos. Son regiones grandes morfológicamente distintivas de la membrana celular las cuales están separadas por barreras. Estas tienen una composición diferente de proteínas y lípidos y de funciones.
- 2) Dominios de agregados de proteínas. La agregación de proteínas dentro de la membrana puede resultar en parches, dominios o capsulas, relativamente grandes, que están enriquecidos con una proteína en particular, acompañadas por otros componentes (lípidos o proteínas) que son favorecidos por dicho ambiente.
- 3) Microdominios de lípidos o balsas. Bajo condiciones apropiadas los lípidos pueden sufrir una separación de la fase lateral produciendo dominios lamelares estables. Esta separación de la fase lateral puede ser inducida por cambios de temperatura, la presión o fuerza iónica o por la adición de cationes bivalentes o proteínas. Su tamaño estimado varia de 40-350 nm de diámetro dependiendo del tipo celular. Las Balsas están enriquecidas con glicoesfingolípidos y colesterol (Anja y Noche, 2003)
- 4) Dominios definidos por el citoesqueleto. Se ha demostrado que los elementos del citoesqueleto – microtubulos, microfilamentos y filamentos intermedios – están involucrados en la compartimentación de muchos lípidos y proteínas de membrana por la organización de componentes específicos de membrana vía interacción con proteínas de citoesqueleto

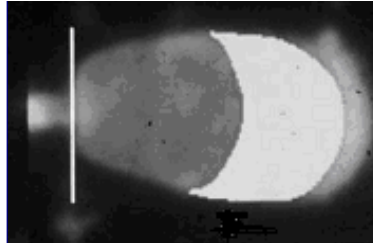
De este último dominio se desprende que el citoesqueleto juega un papel crítico en la estabilización de la membrana y en el mantenimiento funcional de los dominios (Mújica et al., 2003).

Los dominios no son estructuras estáticas estos pueden ser formados y desintegrados continuamente en cuestión de nanosegundos u horas. Aún si la vida de los dominios es mayor las moléculas constituyentes pueden ser rápidamente cambiadas (Witold, 2002).

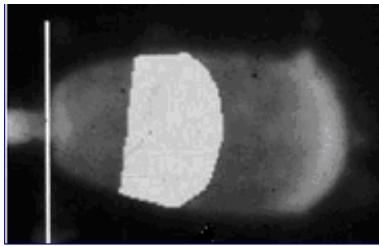
Por otra parte, estudios recientes parecen indicar que algunos tipos de balsas podrían estar asociados con estructuras del citoesqueleto y que estas interacciones podrían tener implicaciones en la regulación de la transducción de señales. Por ejemplo, la unión entre el citoesqueleto y la actina y las balsas de la membrana podrían ser a través de proteínas transmembranales como CD44, la cual puede interactuar con el citoesqueleto a través de su dominio citoplásmico y su asociación preferente con las balsas lipídicas (Maxfield, 2002)

En el caso del espermatozoide una característica única, es que la membrana plasmática de la cabeza esta subdividida en diversos dominios (Figura 4):

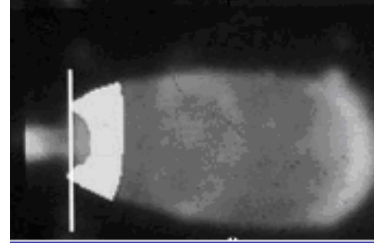
- a) El acrosomal o anterior (capa acrosomal),
- b) El del segmento ecuatorial y
- c) El de la región postacrosomal.



a)



b)



c)

Fuente: Gadella,
1995.

Figura 4. Microscopia de fluorescencia que muestran la nomenclatura y morfología de los subdominios de la membrana plasmática de la cabeza de espermatozoides de cerdo, teñidos con rodamina. Las áreas seleccionadas hacen referencia: a) dominio acrosomal, b) dominio ecuatorial, c) dominio postacrosomal.

Los dominios son establecidos durante la espermiogénesis, sin embargo, éstos sufren cambios en organización y composición durante la vida de la célula como son los procesos de maduración epididimal, la capacitación y la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1994; Gadella, 1995, Mújica et al., 2003). El dominio anterior participa en la reacción acrosomal y el del segmento ecuatorial y la región postacrosomal parecen jugar un papel funcional en los eventos de reconocimiento y fusión con el ovocito (Allen, 1995).

Por la estrecha relación que existe entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de la cabeza espermática se ha sugerido la participación de éste último en el mantenimiento de la integridad y de los dominios de la membrana plasmática.

Lectinas

Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos y que específicamente reconocen estructuras diversas de azúcares y median una variedad de procesos biológicos tales como: la interacción célula-célula y hospedero-patógeno. Las lectinas son muy abundantes en las plantas por lo que son utilizadas en la investigación para estudiar la distribución de los carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares. Las lectinas marcadas con diferentes fluorocromos han sido utilizadas para analizar la expresión, la distribución y las alteraciones de los glicoconjugados de la membrana. Estudios de microscopía de fluorescencia y electrónica usando lectinas han sido realizados en humanos, hamster, borregos, ratas, cerdos y caballos, para demostrar que la distribución de los sitios de unión a lectinas se restringen a ciertas regiones de los espermatozoides. En casi todas las especies examinadas las lectinas se unen a la membrana plasmática y receptores de acrosoma. Los residuos de glucosa, manosa, galactosa y N-acetilglucosamina ha sido encontrados en la cabeza espermática, acrosoma y región ecuatorial, mientras que residuos de fucosa han sido observados, sobre la región acrosomal (Tabla 1).

Tabla 1. Lectinas mayormente usadas en pruebas histoquímicas.

Lectina	Abreviaciones	Especificidad
Concanavalia ensiformes (Jack bean)	CON-A	α - D-Glc, d-D- Man
Arachis hypogea	PNA	Gal-Ba(1-3)-GalNAc
Triticum Vulgare	WGA	(B- [1-4]-D-GLcNAc) ₂ NeuNAc
Ulex europea	UEA	S-L Fucose
Griffonia simplicifolia	GS-I	α - D- Gal
Bandeiraea simplicifolia	BPA	α - AND β -GlcNAc
Glycine mas	SBA	α - D- Gal
Maclura pomifera	MPA	α - D- Gal

Fuente: Ahkuwalia 1990.

CAPACITACIÓN

El espermatozoide de los mamíferos no tiene la habilidad para fertilizar un huevo después de ser eyaculado. Este requiere de un periodo de incubación en el tracto reproductor de la hembra para adquirir dicha habilidad (Holt, 1995).

El termino capacitación puede ser considerado como la suma de cambios bioquímicos y fisiológicos que toman lugar en la célula espermática durante su transito a través del tracto genital de la hembra, comenzando inmediatamente después de la eyaculación y terminando justo antes de la unión del espermatozoide a la zona pelucida. Durante ésta, el espermatozoide sufre una serie de cambios conocidos como capacitación, en los cuales se incluye incremento en la fluidez de membrana, pérdida de colesterol, aumento del calcio intracelular y de las concentraciones de AMPc, fosforilación de proteínas en tirosina, y cambios en los patrones de motilidad (Breitbart, 1999). Todos estos cambios resultan en la activación del espermatozoide y sensibilizan a la célula para responder apropiadamente cuando ésta entre en contacto con el ovocito para lograr una exitosa fertilización. Además, el proceso de capacitación espermática involucra cambios complejos en la composición y orientación de moléculas en la superficie del espermatozoide, en especial en la organización de las proteínas. Durante la capacitación la modificación de la arquitectura de la membrana plasmática, es debido a la remoción de las proteínas epididimales y seminales adsorbidas, también como por la promoción de un desorden lipídico, con la consecuente relocalización de proteína (Tienthai et al., 2004).

El aumento del calcio es debido a la disminución en la función de la ATPasa de Ca^{2+} , dicho aumento de calcio estimula la actividad de la adenilato ciclasa, incrementando la disponibilidad de segundo mensajero AMPc, lo cual a su vez activa a la proteína Cinasa A (PKA) lo que produce la fosforilación de proteínas que se relacionan con los cambios en los patrones de motilidad (Abou, 2000; Tienthai, 2004).

Además una de las consecuencias importantes de la salida del colesterol es la entrada masiva de calcio extracelular, lo cual es un prerrequisito para que ocurra la reacción acrosomal (Martínez y Morros, 1996).

Reacción Acrosomal

La desestabilización de membrana es un paso esencial en el proceso de fusión de membranas. En muchos tipos celulares, la fusión exocítica ocurre solo esporádicamente en sitios microscópicos de la superficie de la célula. La reacción acrosomal (RA), es un proceso de exocitosis regulada, que ocasiona cambios profundos en el espermatozoide, tanto estructurales como funcionales. El acrosoma es una estructura membranosa y ocupa la región anterior de la cabeza del espermatozoide recubriendo al núcleo y se origina del aparato de Golgi. Este organelo contiene enzimas que permiten al espermatozoide atravesar las envolturas que recubren al ovocito. Durante la RA el contenido del acrosoma es liberado (Nicholas L. 1989). Durante la capacitación la pérdida del contenido de colesterol y la asimetría lipídica de la membrana plasmática produce una desestabilización de la monocapa interna que facilita la fusión de membranas durante la unión del espermatozoide con los receptores apropiados del ovocito.

Además, la región de la cabeza de un espermatozoide capacitado expresa receptores específicos para permitir su unión a la zona pelúcida del ovocito, esta unión estimula al espermatozoide a sufrir la RA. Durante este proceso se produce la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en múltiples puntos de la región apical de la cabeza, excepto en el segmento ecuatorial, formándose pequeñas vesículas mixtas que permiten la liberación de enzimas como la acrosina y la hialuronidasa, con la consecuente exposición de la membrana acrosomal interna (Abou y Tulsiani 2000), y la formación de un nuevo dominio de membrana). Ambos fenómenos son esenciales para la fertilización (Haim, 1999) ya que al mismo tiempo el espermatozoide adquiere la habilidad para penetrar la zona pelúcida y para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Cross, 1989). Para su paso a través de la zona pelúcida el espermatozoide crea solo una ranura aproximadamente del tamaño de su cabeza, la cual parece ser generada por una combinación de presión mecánica y digestión enzimática de la zona pelúcida (Haim, 1999). En general, podríamos decir que el control de la reacción acrosomal ocurre entre dos estadios: el primero sería a través de un factor que permite el almacenamiento prolongado de espermatozoide maduro en el tracto reproductor de la hembra, donde el acrosoma debe permanecer intacto y en una condición estable. El segundo, cuando el espermatozoide es transportado por el tracto reproductivo de la hembra, éste debe tener un ambiente adecuado que propicie que el acrosoma comience a desestabilizarse (capacitarse) en preparación para la reacción

acrosomal. Sin embargo, ésta desestabilización no debe causar la liberación del contenido acrosomal. El tercer control ocurre cuando el espermatozoide esta cerca o en asociación con ciertas vestimentas del óvulo. Este es el control final, el disparador que induce la reacción acrosomal. (Oliphant G, 1985, Aida Abou 2000).

Por otra parte, la estrecha relación estructural que existe entre la membrana plasmática y el citoesqueleto soporta el concepto de que elementos de éste último mantienen la integridad de esta región de la cabeza espermática durante la RA y además de que participan en el desplazamiento lateral de ciertas proteínas de membrana o receptores a lo largo de la superficie de la membrana plasmática o posicionándolas en una región en particular (Kaiser, 1984). También, la RA puede ser inducida in Vitro en los espermatozoides capacitados por incubación de los mismos con extractos de zona pelucida solubilizada o con ligandos como la progesterona, el factor de crecimiento epidérmico o el ionóforo de calcio A23187 (Haim B, 1999). Además, los espermatozoides pueden perder el acrosoma cuando mueren (RA falsa o degenerativa)(Nicholas L. 1989).

Como ya se mencionó, la RA es un evento exocitótico que le permite al espermatozoide fecundar al óvulo. Este proceso depende de la presencia de calcio y de un incremento del pH interno. En los mamíferos, el inductor de la RA es una glucoproteína de la zona pelucida (ZP) del ovocito, conocida como ZP3, esta proteína es capaz de elevar la concentración de calcio interno a niveles micromolares en 30-50 milisegundos (Vega, 2002) este flujo de calcio es el mecanismo que dispara la reacción acrosomal y se cree que es promovido por la activación de canales de calcio regulados por proteínas G_i (Abou, 2000).

CRIOPRESERVACION

La congelación de las células tiene el objetivo de preservarlas reduciendo el metabolismo por la exposición de las mismas a bajas temperaturas (Watson, 1995).

La criopreservación de semen ha sido ampliamente benéfica en la cría de animales de importancia en la ganadería, para la conservación de especies en peligro extinción y

para superar aspectos de fertilidad del macho. Sin embargo, a excepción del semen de toro, una baja fertilidad es generada a consecuencia de la criopreservación, en consecuencia la pérdida de la viabilidad por la criopreservación es compensada por la inseminación de un mayor número de espermatozoides. Aún así en muchas especies la fertilidad resultante es más pobre en comparación con el semen fresco. De igual manera usando la mejor técnica de preservación y posdescongelado, la supervivencia de la población espermática es de aproximadamente 50%.

Se conoce que los protocolos de criopreservación conllevan un número potencial de daños sobre las células: primeramente, el producido por el cambio de temperatura; segundo, el estrés osmótico y tóxico ocasionado por la exposición a los crioprotectores; y tercero, la formación y disolución de hielo en el ambiente extracelular (Watson P.F. 2000).

La membrana plasmática y las membranas que envuelven a los organelos como mitocondrias y acrosoma, son vulnerables a los procesos de congelación y descongelación (Córdova, 2003), lo cual podría estar contribuyendo a la pérdida de viabilidad en la célula espermática. Después de la criopreservación muchos espermatozoides tienen hinchado o roto el acrosoma, se ha observado que la membrana plasmática sufre cambios similares a aquellos vistos durante la capacitación y la RA, por lo que su supervivencia es limitada debido a que éstos han sido activados prematuramente para estar en contacto con el ovocito, por lo que si esto no ocurre en un corto tiempo la célula espermática morirá (Watson, 1995)

La membrana plasmática del espermatozoide verraco es más susceptible al proceso de congelación en comparación con la de las otras especies de mamíferos (Córdova, 2003), esto es el espermatozoide congelado-descongelado, se capacita y sufre la RA, más rápido que el espermatozoide fresco (McLaughlin, 1993., M. Ollero, 1998), debido a que el enfriado produce una despolimerización de la actina, evento que se da para acercar la membrana plasmática a la membrana acrosomal externa. El proceso de congelado-descongelado provoca alteraciones a las estructuras espermáticas mencionando que la más afectada es la membrana plasmática, la cual se ancla a la Teca perinuclear por medio de proteínas transmembranales (Bravo M. S, *et al* 2006). Así mismo muchas proteínas del citoesqueleto se ven alteradas durante los cambios

osmóticos y de temperatura. Estudios realizados por Juárez Mosqueda y Martínez Omega demostraron que la teca perinuclear de espermatozoide de toro es dañado por el proceso de criopreservación proponiendo que el decremento en la viabilidad de semen criopreservado puede ser atribuido no solo a un daño en la membrana plasmática sino a un daño en elementos internos como el citoesqueleto (del cual la TP es el principal elemento), resultando en una parcial o total pérdida de la subestructura (Juárez, Omega 2005). También se ha encontrado daño en el acrosoma en comparación con el daño de la TP, esto reduce la viabilidad de las células espermáticas después del proceso de congelación (Arancibia KS, et al 2006). Como es sabido muchas de las proteínas del citoesqueleto sufren una despolimerización y repolimerización dependiendo de la temperatura, lo cual podría tener implicaciones muy significativas en la criopreservación del espermatozoide (Bravo M.S, et al., 2006)

TECA PERINUCLEAR

La teca perinuclear es la principal estructura citoesquelética de la cabeza espermatozoides de mamíferos, ésta cubre al núcleo excepto en la zona en donde se inserta el flagelo. Debido a que las proteínas de la teca perinuclear se localizan por debajo del acrosoma estas pueden tener un papel importante al unir al acrosoma con el núcleo espermático (Oko R 1994). Además, se ha considerado que la teca perinuclear une y estabiliza las membranas espermáticas asociadas con la cabeza. Esta estructura muestra dos distintas regiones, una capa subacrosomal o perforatorium que se continúa con la hoja postacrosomal la cual se extiende en dirección caudal y subyace directamente con la membrana plasmática. Datos publicados indican que la composición proteica de estas dos regiones difiere (Bellve R, 1992).

También se ha propuesto que las proteínas de la TP pueden servir para estabilizar las membranas (la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática) de la región ecuatorial, previniéndolas de la vesiculización durante la RA. Se ha demostrado que las membranas acrosomal y plasmática de la región ecuatorial permanecen intactas durante la migración del espermatozoide a través de la zona pelucida y que la penetración del espermatozoide en el huevo, es iniciada por la fusión de la membrana plasmática del segmento ecuatorial con la membrana del huevo. Por lo

que para estabilizar las membranas de la región ecuatorial, las proteínas de la teca perinuclear pueden jugar un papel importante en el proceso de fertilización.

La integridad de la TP es de crucial importancia para el funcionamiento del espermatozoide. En los últimos años diversas investigaciones señalan la participación de la TP en importantes funciones espermáticas como el mantenimiento de dominios de la membrana plasmática de la cabeza, en la integridad del acrosoma y del núcleo, en la activación del ovocito, entre otras varias (Buhr M., 1989).

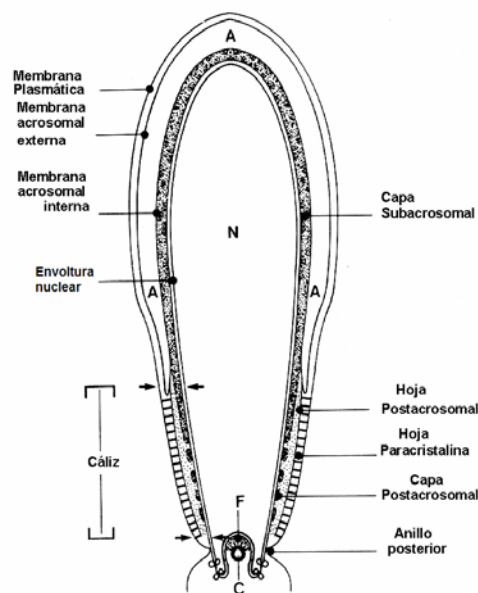


Figura 5. Morfología de la subestructura de la TP de espermatozoides de cerdo

Justificación.

Las conexiones que se establecen entre proteínas de la membrana plasmática y el citoesqueleto controlan la forma celular, delimitan dominios especializados de membrana, y estabilizan las uniones con otras células para cumplir una función específica, sin embargo esto puede ser afectado por el proceso de congelación de las células.

III. Hipótesis.

El daño producido sobre la teca perinuclear por el proceso de criopreservación del espermatozoide alterando los dominios de la membrana plasmática de la cabeza.

IV. Objetivos.

General

- ◆ Identificar la distribución de los dominios de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo antes y después del congelado.

Específicos

- ◆ Evaluar si la teca perinuclear sufre alguna desestabilización después del proceso congelado-descongelado.
- ◆ Determinar si el daño a la TP, se relaciona con los dominios de la membrana plasmática.

V. Material y Métodos.

1. Modelo experimental.

Se utilizaron 7 eyaculados de sementales sexualmente activos de las razas comerciales Yorkshire, Landrace y Duroc. De cada uno se obtuvieron dos eyaculados y del Landrace se trabajaron 3 muestras.

Los eyaculados fueron divididos en dos grupos: uno se utilizó en fresco y otro se trabajó para su procesamiento de congelación/descongelación, de ambas muestras se tomaron alícuotas que se utilizaron para evaluar: la viabilidad espermática, la integridad de la subestructura de la TP y la distribución de los dominios de membrana plasmática.

Los parámetros para evaluar la viabilidad espermática fueron:

- Concentración,
- morfología espermática,
- movimiento progresivo e
- integridad del acrosoma y el porcentaje de vivos y muertos.

Los dos primeros parámetros solo se evaluaron en espermatozoides de semen fresco. Para el proceso de criopreservación de las muestras, solo se utilizaron los eyaculados que presentaron una motilidad superior al 80% y un porcentaje de morfoanomalías no mayor a 15%.

2. PROCEDIMIENTOS

2.1. Obtención de la Muestra

Los eyaculados (solo fracción rica) fueron obtenidos por el método de la mano enguantada, los cuales fueron depositados en un termo previamente atemperado 38 °C, separando la fracción gelatinosa por el paso de los eyaculados a través de una gasa estéril.

Obtenida la muestra se evaluó el volumen y se diluyó a una proporción 1:4 con el medio comercial de larga duración IMV USA870XT-R y se transportó en un recipiente hermético a una temperatura de 20-23 °C al laboratorio de Morfología de la Facultad de

Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. Al llegar al laboratorio los eyaculados fueron centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos con la finalidad de extraer el líquido seminal, así como el diluyente. Una parte de la a pastilla es resuspendida en PBS (8.0 gr de NaCl, 0.2 gr de KCl, 0.2 grs KH_2PO_4 , 2.47 gr Na_2HPO_4) y la otra fue procesada para su congelamiento.

Para determinar la concentración de células 50µl de cada muestra obtenida fue diluida en un ml Triton X-100 al 0.1% en PBS y cuantificada en una cámara de Neubauer. Se contaron cinco recuadros y se aplicó la siguiente ecuación para obtener el total de espermatozoides: factor de dilución (21) x # de células contadas x 10,000 (dimensión de la cámara) x 5 (número de cuadros contados).

La evaluación del movimiento progresivo se realizó en alícuotas de semen observadas al microscopio de luz, marca Carl Zeiss con el objetivo de 40x.

El porcentaje de anomalías morfológicas se efectuó junto con el conteo celular.

2.2. Congelación de semen

Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el método descrito por Westendorf et al., 1975, modificado por Tilman, 1997. Una vez centrifugadas las muestras las pastillas fueron resuspendidas en el diluyente A o de refrigeración (dextrosa 11%, yema de huevo 20%; en agua destilada) atemperado a la temperatura a la que se recibió el semen y ajustando la concentración a 1200×10^6 espermatozoides/ml. Las muestras se dejaron equilibrar durante 3 horas a 16 °C. Posteriormente el diluyente B o de congelación (dextrosa 11%, yema de huevo 20% y glicerol 6% en agua destilada) a 4°C, fue adicionado en relación 1:1 agregándose de manera gradual al 5, 10, 15, 20% del volumen total de almacenado, con intervalos de 10 minutos entre cada adición y se mantuvo por un periodo de equilibrio de 90 minutos en cámara fría a 4 °C.

Finalmente las muestras fueron envasadas en pajillas (0.5 ml), manteniendo una concentración final de 300×10^6 espermatozoides/0.5ml y se sellaron con plastilina epóxica (no toxica) para ser expuestas a vapores de nitrógeno líquido a unos 4 cm. de distancia, para alcanzar una temperatura entre -130 a -150 °C, durante 20 minutos y

posteriormente fueron sumergidas en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y almacenadas hasta su uso.

2.3. Descongelación

Las pajillas fueron descongeladas en baño María a $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, enseguida, los espermatozoides fueron lavados 5 veces por centrifugación/resuspensión a 1500 rpm/10 minutos, una vez en BTS (medio de descongelación) y las otras cuatro en PBS. y fueron sometidas al mismo proceso de evaluación que las muestras de semen frescas.

2.4 Evaluación de la integridad del acrosoma y porcentaje de vivos y muertos.

La integridad del acrosoma y el porcentaje de vivos y muertos se evaluó empleando la técnica Talbot y Chacón (descrita por Garde, 1992)

Las muestras tanto de semen fresco como descongelado fueron ajustadas a una concentración de 25×10^6 células/ml en PBS. En un tubo se colocaron 100 μl de semen y 100 μl de azul de tripán al 2% en PBS y se dejaron incubar a 37°C durante 15 min. Enseguida las muestras fueron centrifugadas y lavadas en PBS por centrifugación/resuspensión a 1200 rpm x 3 minutos hasta que el sobrenadante se observara transparente. A continuación las células fueron fijadas adicionando 0.5 ml de glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato (0.1 mM, pH 7.4) y se dejó incubar 30 minutos a 4°C , pasado este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 1200 rpm/8 minutos, el sobrenadante fue eliminado y las células fueron lavadas en 1 ml de PBS, en dos ocasiones y resuspendidas en el mismo volumen. Una muestra alícuota fue tomada para preparar un frotis que se dejó secar al aire. En seguida se procedió a teñir el frotis con Café Birsmak al 0.8 % en solución acuosa, pH 1.8, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Los frotis fueron enjuagados con agua destilada y se dejaron escurrir para teñirlos con rosa de bengala al 0.8% en amortiguador Tris 0.1 M, pH 5.3 a temperatura ambiente por 1 minuto. Pasado el tiempo los frotis fueron enjuagados y montados con resina para su evaluación en el microscopio de luz Carl Zeiss con el objetivo de 40X, cien células fueron contadas por cada frotis.

Con este método las células espermáticas se pueden clasificar en cuatro patrones diferentes:

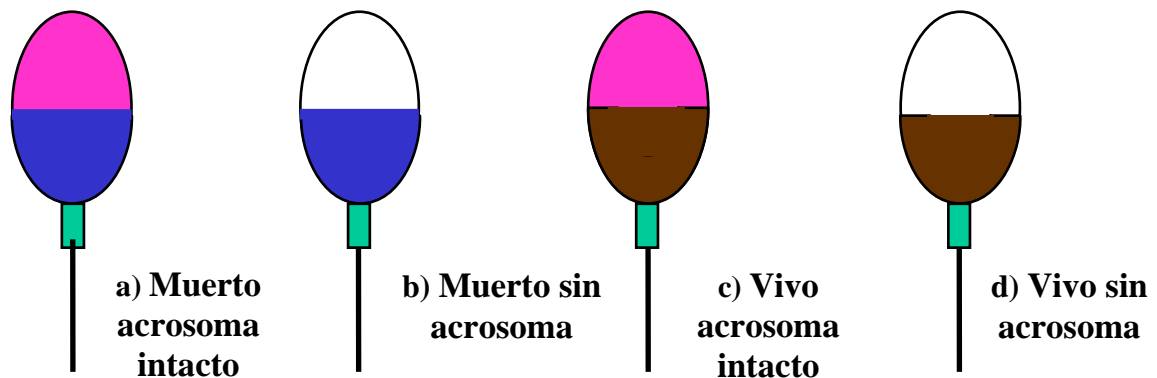


Figura 6. Clasificación de los patrones de las células espermáticas teñidas por la Técnica de Triple Tinción

Vivo acrosoma intacto: (acrosoma teñido de rosa y región postacrosomal de color marrón oscuro).

Vivo sin acrosoma: (región acrosomal transparente y región postacrosomal teñidas de marrón)

Muerto acrosoma intacto: región acrosomal teñido de rosa y región postacrosomal teñida de azul ambas regiones se ven levemente teñidas.

Muerto sin acrosoma: (región acrosomal transparente y región postacrosomal de color azul).

3. Identificación de la distribución de los dominios de membrana

Para identificar la distribución de los dominios de membrana plasmática en la cabeza espermática se emplearon las lecitinas WGA y CON-A acopladas a isotiocianato de fluoresceína (FITC). La WGA identifica los residuos de N-acetylglucosamina y ácido sialico, y la CON-A se une a los residuos de manosa, glucosa, galactosa y galactosamina

Las muestras tanto de semen fresco como descongelado fueron resuspendidas a una concentración de 25×10^6 células/ml las cuales fueron fijadas en 1 ml de formaldehído al 3% en PBS durante 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas, el

sobrenadante fue descartado y la pastilla fue lavada dos veces en PBS y resuspendidas en el volumen inicial en cloruro de amonio 50 mM en PBS, y se dejaron incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida las muestras se centrifugaron y la pastilla fue lavada tres veces en PBS y tres veces en agua destilada y resuspendida en esta ultima en el volumen inicial. Muestras alícuotas de 30 μ l fueron tomadas para realizar frotis los cuales se dejaron secar al aire. Después las laminillas fueron colocadas en vasos de koplín y enjuagadas 5 veces en PBS, posteriormente las células fueron incubadas para su bloqueo en BSA al .01 % en PBS por 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Enseguida las laminillas se lavaron tres veces en PBS durante 5 minutos cada uno, las muestras se dejaron secar al aire y se les aplicó 7 μ l de las lectinas marcadas (WGA, CON-A), por separado, en un cuarto oscuro y se incubaron durante 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Pasado el tiempo se procedió a lavar 5 veces en PBS, por 5 minutos cada uno, una vez lavadas las muestras se montaron con una gota del medio de montaje (PBS/glicerol 1:1) y se sellaron con barniz de uñas. Finalmente se observaron en el microscopio confocal a un aumento de 63X en la unidad de investigaciones Biomédicas de la Fes-Cuautitlán. Durante las observaciones al microscopio se realizaron cortes ópticos de .407--3256 micras de profundidad desde la superficie externa hacia el interior de la célula espermática para con ello definir si la localización de las lectinas se daba únicamente en la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides.

Exposición de la TP

Para exponer la TP, los espermatozoides `provenientes de semen fresco y descongelados fueron lavados en solución salina 154nM, resuspendidos en la misma a una concentración de 35X10⁶ células/ml. y tratadas con el detergente neutro Brij 36-T (1.2% concentración final) durante 10 minutos a temperatura ambiente (Mújica, 1979; Juárez, 1995). Los espermatozoides fueron fijados con Karnowsky (Karnowsky, 1995) por un mínimo de 20 minutos a temperatura ambiente y procesados para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET).

Microscopia electrónica (MET).

Para retirar el fijador los espermatozoides se centrifugaron a 2,500 rpm por 3 minutos (lavado), la pastilla fue lavada tres veces en PBS y dos veces en agua desionizada, y resuspendida en su volumen inicial en esta última. Una gota (20 µl) de la solución espermática fue colocada sobre rejillas de cobre de 200 mesh (cubiertas con membranas de soporte colodión-carbón), donde se dejó que sedimentarán 10 minutos, el exceso de muestra fue retirado y las células se tiñen con ácido fosfotúngstico al 0.2% en solución acuosa por 2 minutos, las rejillas fueron lavadas en una gota de agua. Para la evaluación de la subestructura de la TP las rejillas fueron observadas en el MET Carl Zeiss EM900, (50 kv) operado a 50v.

Análisis Estadístico.

Las variables a medir fueron:

Número de espermatozoides vivos con acrosoma.

Número de espermatozoides muertos con acrosoma.

Número de espermatozoides vivos sin acrosoma.

Número de espermatozoides muertos sin acrosoma.

Número de espermatozoides con la subestructura TP normal, alterada y ausente.

Número de espermatozoide por dominios de membrana plasmática en la cabeza.

Pruebas estadísticas:

Las variables anteriores fueron analizadas por la prueba de T pareadas por tratamiento utilizado (fresco y descongelado).

Se realizó prueba correlación de Pearson entre integridad de la subestructura de la TP y los dominios presentes por tratamiento (CON-A y WGA)

VI. RESULTADOS

Evaluación espermática

La concentración espermática en promedio de los eyaculados obtenidos fue de 160×10^6 células/m

En la tabla 2 se presentan los resultados encontrados al evaluar la integridad del acrosoma y la viabilidad espermática. En el semen fresco la integridad del acrosoma fue de 43.71 ± 4.75 (P < 0.05). Para el caso de los espermatozoides muertos con acrosoma intacto los porcentajes obtenidos fueron 19.29 ± 5.61 y 12 ± 5.52 en el semen descongelados y frescos, respectivamente (P > 0.05).

Por otra parte, $6.71 \pm 2.91\%$ de los espermatozoides de semen fresco se presentaron vivos sin acrosoma, mientras que en semen descongelados fue $29.29 \pm 7.67\%$ (P < 0.05); en el caso de los espermatozoides de semen fresco $5.57 \pm 2.1\%$ se encontraron muertos sin acrosoma, mientras que en el semen descongelados el porcentaje para este tipo de células fue del 14.71 ± 5.41 .

Tabla 2. Evaluación de la integridad del acrosoma y la viabilidad espermática en semen fresco y descongelado**.

Tratamiento	Vivo con acrosoma %	Vivo sin acrosoma %	Muerto con acrosoma %	Muerto sin acrosoma %
Fresco	$75.71 \pm 5.67a$	$6.71 \pm 2.91a$	$12.0 \pm 5.52a$	$5.57 \pm 2.10a$
Descongelado	$43.71 \pm 4.75 b$	$22.29 \pm 7.67b$	$19.29 \pm 5.61a$	$14.71 \pm 5.41 a$

*Literales diferentes por columna representan diferencia significativa (P < 0.05).

**Técnica de triple tinción.

Identificación de los dominios

Los patrones de fluorescencia observados con la Concanavalina A (Figura 7) fueron 5:

- Fluorescencia sobre la región acrosomal/apical (Patrón A)(Figura 7a y b).
- Fluorescencia irregular en la región acrosomal (Patrón B) (Figura 7c).
- Sin fluorescencia en la región ecuatorial (Patrón C) (Figura 7d).
- Fluorescencia en la región ecuatorial (Patrón D) (Figura 7e).
- Fluorescencia en la región postacrosomal (Patrón E) (Figura 7f).

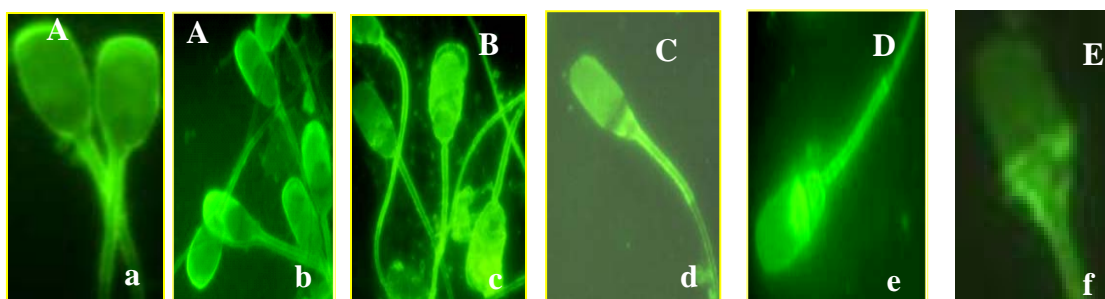


Tabla G

Fresco	83 ± 5.93^a	10.86 ± 3.49^a	4.14 ± 2.51^a	0.43 ± 0.43^a
Descongelado	39.43 ± 2.96^b	21.43 ± 2.06^b	10.86 ± 5.14^a	16.00 ± 6.27^a

Literales diferentes entre columnas muestran significancia estadística

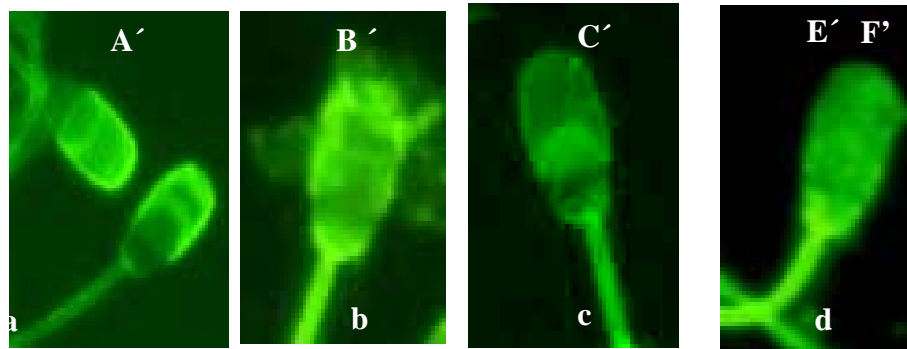
Figuras 7. Microscopia de fluorescencia mostrando los distintos patrones encontrados en la membrana plasmática con la lectina Con-A en los espermatozoides frescos y descongelados. a y b) Fluorescencia sobre la región acrosomal/apical, c) Fluorescencia irregular en la región acrosomal d) Sin fluorescencia en la región ecuatorial e) Fluorescencia en la región ecuatorial f) Fluorescencia en la región postacrosomal. G) Tabla mostrando los porcentajes de los patrones de los dominios de membrana en espermatozoides frescos y descongelados.

En la tabla G se observa la distribución de los dominios de los espermatozoides trabajados con la lectina Con-A se pudo observar una fuerte distribución en el patrón acrosomal/apical 83 ± 5.93 semen fresco, esto tuvo una disminución de 39.43 ± 2.96 al descongelado, se vio un notorio cambio en la redistribución de los dominios ya que la concentración mas alta de espermatozoides que mostraron fuerte fluorescencia fueron los de la región ecuatorial con

un $0.43 \pm 0.43\%$ y un $16 \pm 6.27\%$ respectivamente, así como los de fluorescencia irregular en la región acrosomal con un $12.29 \pm 5.02\%$ en fresco y $10.86 \pm 3.49\%$. Al comparar los espermatozoides frescos con los descongelados en el caso del patrón A, éste fue mayor en el caso de los primeros pero esta tendencia se invierte con respecto a los demás patrón ($P < 0.05$).

En la figura 8 se presentan los patrones encontrados con la WGA:

- Fluorescencia en la región acrosomal (Patrón B') (Figura 8a).
- Fluorescencia irregular en la región acrosomal (Patrón C')(Figura 8b).
- Fluorescencia en la región ecuatorial (Patrón E') (Figura 8c).
- Fluorescencia en la región postacrosomal (Patrón F')(Figura 8d).



F	A'	B'	C'	E' F'
Fresco	74.7 ± 13.2^a	13.43 ± 4.49^a	10.9 ± 10.9^a	1.00 ± 0.49^a
Descongelado	21.3 ± 8.2^b	18.29 ± 2.53^a	54.6 ± 11.1^b	5.86 ± 1.99^a

* Literales diferentes entre columnas muestran significancia estadística

Figuras 8. Distribución de los cuatro dominios de la membrana plasmática de la cabeza de los espermatozoides frescos con lectina WGA unida a un fluorocromo.

En la parte inferior de la figura 7 se muestra el porcentaje de células espermáticas que fueron trabajadas con lectina WGA. De las cuales la región más característica fue la de la región acrosomal en la cual la fluorescencia se apreciaba fuertemente sobre todo en espermatozoides frescos 74.7 ± 13.2 y se apreció una diferencia notable en la muestra descongelada 21.3 ± 8.2 . El patrón estadísticamente más apreciable al momento del descongelado fue el que se presentó en la región ecuatorial

10.9±10.9 en semen fresco y aumento al momento del descongelado 54.6±11.1. Sin embargo al comparar los espermatozoides frescos con los descongelados en el caso del patrón A, éste fue mayor en el caso de los primeros pero esta tendencia se invierte con respecto a los demás patrón (P<0.05).

INTEGRIDAD DE LA SUBESTRUCTURA

La integridad de la subestructura de la teca perinuclear fue clasificada como normal cuando esta presenta forma de grecas (9a); y como alterada, cuando la subestructura presentaba una discontinuidad o ausencia de la subestructura (9b y c respectivamente).

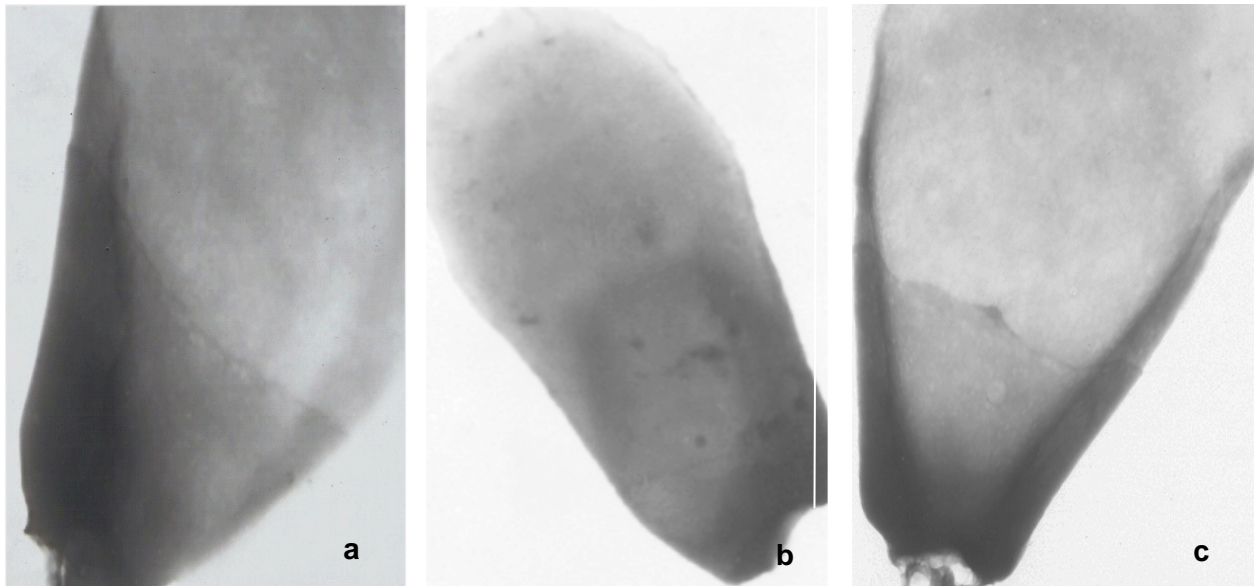
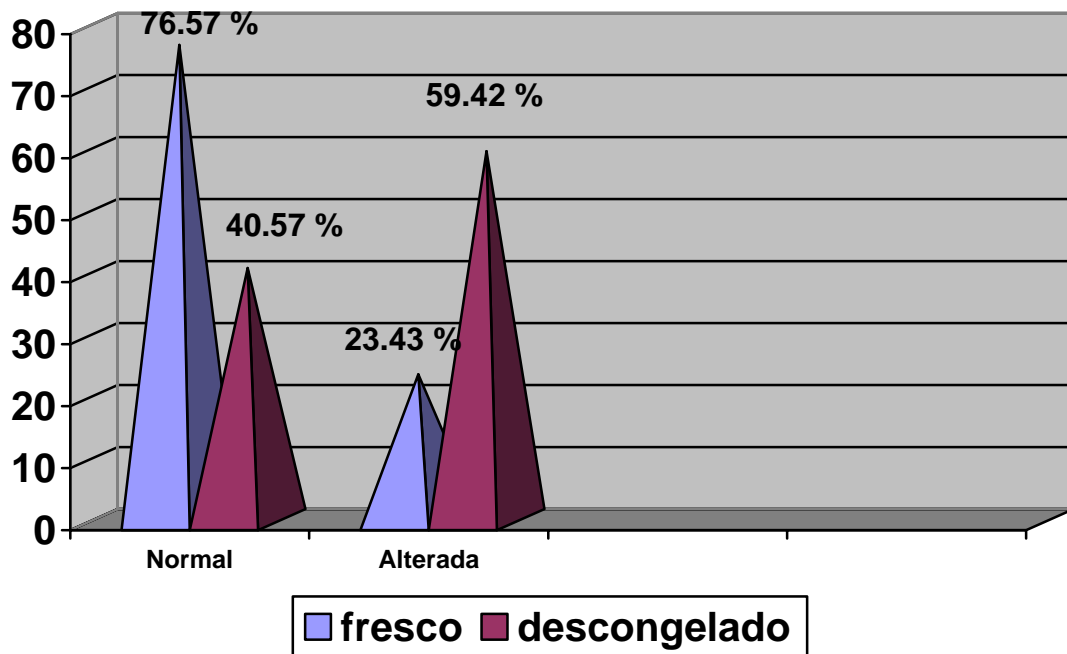


Figura 9. Microfotografías de cabezas espermáticas mostrando la integridad de la TP. a) Normal en la que se observan grecas y continuidad en las mismas, b) alterada se presenta discontinuidad en las grecas, c) sin subestructura estas células no presentan grecas.

En la grafica 1 se presentan los valores obtenidos al evaluar la integridad de la subestructura de la TP. En los espermatozoides provenientes de semen fresco fueron del 76.57± %, 23.43±%, para normal y alterada respectivamente, mientras

que los valores en el semen descongelado fueron del 40.57 %, 59.42%, respectivamente ($P < 0.05$). Al comparar los porcentajes entre los espermatozoides frescos y descongelados hubo una diferencia del 36% en el caso de la subestructura normal, y del 35.99% para subestructura alterada ($P > 0.05$)



Gráfica 1. Comparación entre el porcentaje de la integridad morfológica de la subestructura de la teca perinuclear en los espermatozoides frescos y descongelados.

Relación entre la distribución de los dominios membrana y la integridad de la teca perinuclear.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de spearman entre la integridad de la subestructura de la teca perinuclear y los patrones de los dominios de membrana en espermatozoides frescos y descongelados con las lectinas Wga y Con-A en espermatozoides y descongelados.

Integridad/Dominios PATRON FRESCO	NORMAL	ALTERADA
A	0.7611	0.-7611
B,C, D, E	0.-7611	0.7611
B`	0.7176	0.-7176
C`, D`, E` y F`	0.-7176	0.7176

En la tabla 3 se presentan los datos de la correlación de Spearman entre la integridad de la subestructura de la teca perinuclear con distribución de los dominios en espermatozoides frescos y descongelados donde se muestra una alta correlación así mismo se encontró alta significancia $p < 0.01$. en ambos tratamientos. Observando que cuando la teca se encuentra normal, los patrones A y B` patrones considerados como normales, se presentan en mayor proporción para lectina Con-A y Wga respectivamente. Cuando la teca esta alterada los patrones B,C,D,E, y C',D',E',F, se presentan.

VII. DISCUSIÓN

La importancia del estudio del mantenimiento de dominios de membrana es que estos tienen funciones importantes en los procesos de fertilización, capacitación y reacción acrosomal. Es por ello que es de suma relevancia analizar la distribución de dominios de membrana y su asociación con proteínas de citoesqueleto de la espermática.

Para evaluar la integridad y estabilidad de los glicoconjugados de la membrana plasmática, se emplearon las lectinas CON-A, WGA (FITC). Las lectinas son proteínas que se unen a los glicolípidos y glucoproteínas que se encuentran en la superficie de membrana del espermatozoide. Esta unión es restringida en ciertos dominios de la célula (segmento acrosomal, ecuatorial y postacrosomal) Koheler 1980. mostró la unión lipido-lipido y glicoconjugados tanto en la membrana plasmática como en el flagelo.

En el presente estudio se demostró que existe una redistribución de los dominios de membrana durante el proceso de congelación y descongelación en los espermatozoides cerdo, los cuales son similares a los inducidos durante la capacitación *in vivo* y estos cambios han sido llamados criocapitación. Además, los espermatozoides criopreservados tienen niveles relativamente altos de reacción acrosomal, la cual se da debido a cambios en la organización existente de las macromoléculas de membrana, la temperatura es un factor importante que afecta la difusión de los componentes de membrana, por lo tanto, se han investigado los cambios en la distribución lipídica en la membrana espermática en relación con el shock frío así como las implicaciones en el comportamiento de las membranas en relación con la temperatura, (Catherine Labbe.1997). En esta investigación, los espermatozoides descongelados, sufrieron un proceso semejante a lo descrito por Petrunkina, 2004., Sin embargo debido a que nosotros no inducimos la capacitación, se ha considerado que estos cambios suceden de manera espontánea, debido al proceso de congelación.

La demostración del movimiento lateral y el flujo de glicolípidos en espermatozoides que son sometidos al proceso de congelación, de la región acrosomal y apical al subdominio ecuatorial o posacrosomal implican que otros lípidos de membrana viajan en dirección opuesta. El movimiento hacia la región apical podría incrementar la

fluidez de la membrana en esta región, de esta manera facilita la exocitosis acrosomal. Una redistribución de proteínas la membrana plasmática de la cabeza de semen de cerdo fue reportada por Aguas Pinto da Silva 1989, Gadella 1995, al inducir la capacitación *in vitro*.

La valoración de los dominios presentes en los espermatozoides, se realizó en el microscopio de fluorescencia, en base a la detección de la región fluorescente. A diferencia de Peterson 1987. Que reportó 5 dominios en el espermatozoide, siendo tres de ellos en la región de la cabeza (dominio del acrosoma, del segmento ecuatorial y el del segmento postacrosomal), en nuestro trabajo hemos observado 5 patrones para espermatozoides que fueron teñidos con la lectina Con -A y 4 patrones teñidos con la WGA.

En el presente estudio en ambas lectinas encontramos patrones semejantes a los reportados por Peterson 1987, sin embargo para la lectina WGA presento un patrón el cual llamamos patrón C (Fluorescencia irregular en la región acrosomal) ya que en estos espermatozoides se apreciaba material fluorescente que se encontraba desprendido en la región acrosomal, para la lectina Con-A se encontraron los reportados por Peterson además del patrón mencionado para la Con-A. este patrón es visto en espermatozoides en los cuales la membrana plasmática ya no está presente.

Los cuatro patrones que se encontraron con la lectina WGA se vieron alterados durante la congelación cambiando de un porcentaje alto en la región acrosomal en semen fresco esto se vio modificado ya que al momento del descongelado la región ecuatorial se vio con un porcentaje mayor que los demás patrones.

Para el caso de la Con-A el patrón predominante tanto en fresco como en descongelado, fue el de la región acrosomal/apical, sin embargo el semen descongelado mostró una redistribución mayor en el patrón B (Fluorescencia irregular en la región acrosomal) a comparación del resto de los patrones.

Otra área de la estructura espermática la cual ha repercutido sobre su función son las proteínas del citoesqueleto las cuales sufren una despolimerización y

repolimerización. Estudios hechos por Watson 1995, han demostrado implicaciones del citoesqueleto que soporta la membrana plasmática y acrosomal cuando la célula es expuesta a cambios en su volumen, es aparente que los eventos de membrana tienen efectos sobre mecanismos intracelulares, quizás por los cambios que ocurren en la permeabilidad, estas podrían tener implicaciones importantes durante la criopreservación de la célula espermática.

La teca perinuclear (TP) es el principal elemento citoesquelético de la cabeza de los espermatozoides de mamífero (Longo et. al. 1987, Juárez 1999) y su integridad es de crucial importancia para el funcionamiento del espermatozoide. En los últimos años diversas investigaciones señalan la participación de la TP en importantes funciones espermáticas como el mantenimiento de dominios de la membrana plasmática de la cabeza, en la integridad del acrosoma y del núcleo, en la activación del ovocito, entre otras más. Buhr 1989.

La predominancia de la fluorescencia en la región acrosomal hacia la región ecuatorial, como presentamos en los resultados, nos sugiere que hubo una redistribución en los dominios por el proceso de congelación, redistribución que no se hubiera dado con un citoesqueleto íntegro ya que el mantenimiento de dominios está dado por los anclajes al citoesqueleto que restringen el movimiento de los gliconjugados

La membrana plasmática subyacente a la membrana acrosomal externa del segmento principal de la cabeza espermática es de particular interés debido a que la organización de este dominio juega un papel directo en la reacción acrosomal. (Peterson 1987).

Recientes estudios han indicado que algunos tipos de dominios de la membrana plasmática pueden ser asociados con estructuras del citoesqueleto, y estas interacciones pueden tener implicaciones en la regulación de transducción de señales (Maxfield 2002).

VIII. CONCLUSIONES

Es necesario realizar otros estudios encaminados a conocer la participación de las proteínas de la TP, para determinar que proteínas de la Teca se están afectando para relacionar directamente con esta pérdida de los dominios.

IX. LITERATURA CITADA.

Aguas, A. P. and Pinto da Silva, P. (1989). Bimodal redistribution of surface transmembrane glycoproteins during Ca^{2+} dependent secretion (acrosome reaction) in boar spermatozoa. *J. Cell Science*. 93, 467-479.

Aida Abou Halia and Daulat R.P. Tulsiani. 2000. Mammalian Sperm Acrosome formation, contents and function

Ahluwalia B, Farshori P, Jamuar M, Baccetti B, and Anderson W.A. 1990. Specific localization of lectins in boar and bull spermatozoa. *J. Submicrosc. Cytol Pathol*. 22 (1), 53-62.

Anja Nohe, Keating E, Petersen Nils O. 2003. Dynamics of Membrana Domains on the Cell Surface. *Advances in Nanostructural Genomics III*.

Arancibia-Salinas K., Juárez-Mosqueda ML., Hernández-González EO, Montaldo Valdenegro HH, Gutiérrez CG y Trujillo Ortega ME. Integridad de la teca perinuclear y el acrosoma en semen fresco y congelado-descongelado de cerdo. *Memorias del XLI Congreso Nacional AMVEC 2006*. pp 45.

B.M Gadella.1996. Lipid changes in the plasma membrane of capacitating boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol 31.

Barros C, Bedford JM, Franklin LE, Austin CR. 1967. Membrana vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J Cell Biol* 34:C1-C5.

Bellve R Anthony, R Chandrika, Yordanka S. Martinova and Alinda H. Barth. 1992. The matrix Perinuclear as a structural element of the mouse sperm nucleus. *Biology of Reproduction* 47,451-465.

Bleil JD and Wasarman PM. 1986. Autoradiographic visualization of the Mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biology* 102: 1363-1371.

Breitbart Haim and Naor Zvi. 1999. Protein Kinase in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Reviews of Reproduction*. 4, 151-159.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Lewis. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega.

Buhr M. Canvin., Bauley. L . 1989. Effects of preservation on Boar Spermatozoa head Membranas. *Gamete Research*. 23:441-449.

Buhr M.M.1991 Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. *Reproduction Domestic Animal*. Supplement 1:81-93)

Caroline A. Wolfe, *et al.* 1998. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59, 1506-1514.

Córdova I. 2003. II congreso de egresados de la UAM Xochimilco.

E.A. McLaughlin, W.C.L Ford and M.G.R. Hull. 1993. Effects of cryopreservation on the human sperm acrome and its response to A23187. *Journal of Reproduction and Fertility*. 99,71-76.

E.M. Eddy and Deborah A. O'Brien. 1994. The spermatozoon. *The physiology of Reproduction* 2° ed.

Flatherty Sean P. and Olson Gary E. 1988. Membrana Domains in Guinea Pig Sperm and Their Role in the Membrana Fusion events of the Acrosome Reaction. *The anatomical Record* 220: 267-280.

Frank J. Longo, Georg Krohne, and Werner W. Franke. 1987. Basic Proteins of the Perinuclear Theca of Mammalian Spermatozoa and Spermatids: A Novel Class of Cytoeskeletal Elements. *Journal Cell Biology*. 105: 1105-1120.

- Gadella B.M, Cardozo LM, Van Golde L.M.G., Colenbrander B. and Gazella T.W.J. 1995. Glycolipid migration from the apical to the ecuatorial subdomains of the sperm head plasma membrana precedes the acrosome reaction. Evidence for primary capacitation event in boar espermatozoo. *Journal of Cell Science* 108, 935-945.
- Garde J., Artiga GC, Gutiérrez A., Vázquez, I. 1992. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med Vet.* vol nº 2.
- Jamil Kaiser. 1984. Plasma Membrane Cytoeskeletal Complex of the mammalian spermatozoa. *Archives of andrology* 13:177-193.
- John E. Parks, Janice W. Arion and R.H. Foote. 1987. Lipids of plasma membrana and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. 37, 1249- 1258.
- Juárez ML. 2000. Caracterización de una Nueva Subestructura de la Teca Perinuclear del Espermatozoide Maduro no Capacitado del Cobayo. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Pg: 6
- Katerina Dvoráková, Harry D. M. Moore, Natasa Sebková & Jirí Palecek. 2005. Cytoskeleton Localization in the Sperm Head Prior to Fertilization. *Reproduction* 130: 61 – 69.
- Labbe Catherine., Lois M Crowe and John H Crowe. 1997. Stability of the lipid component of trout Sperm plasma membrane during –Thawing. *Cryobiology* 34, 176-182.
- Luna J. E. and Anne L. Hitt. 1992. Cytoskeleton –Plasma Membrane Interactions. *Science*. Vol 258. 6 November.
- M. Ollero. O. Bescos, J.A. Cebrian -Perez and T. Muiño -Blanco. 1998. Loss of Plasma Membrane Proteins Of Bull Spermatozoa Trough The Freezing –Thawing Process. *Theriogenology* 49:547-565.

M.M. Buhr, A.T.Canvin, and .L Bailey. 1989. Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Research*. 23:441-449.

Martell BS, García TSG, Trujillo OME, Hernández HJM, Juárez-MML. Redistribución de la actina de la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo después de la congelación-descongelación. *Memorias del XLI Congreso Nacional AMVEC 2006*. pp 44.

Meizel Stanley. 1985 Molecules that or help Stimulate the Acrosome Reaccion by their interaction with the Mammalian Sperm Surface. *The American Journal of Anatomy*. 174:285-302

Mujica Adela, Fernando Navarro – García, enrique O. Hernández – González & Maria de Lourdes Juárez – Mosqueda. (2003). *Microscopy research & technique* 61: 76 – 87

Nicholas L. Cross and Stanley Meizel. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 41, 635-641.

Nolan JP and Hammerstedt R. 1997. Regulation of membrana stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 11: 670-682.

Oliphant G, Reinolds Al B and Thomas S. Ted. 1985. Sperm surface componentes involved in the control of the reaction acrosomal. *The American Journal of Anatomy* 174:269-283.

Peter Sutovsky, Joao Ramalho-Santos, Ricardo D. Moreno, Richard Oko, Laura Hewitson y Gerald Schatten. On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe Mito Tracker TM and high resolution differential interference contrast microscopy. 1999. *Human Reproduction* Vol. 14 no.9 pag. 2301-2312

Petrunkina A.M. *et al.* 2004. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology*. Vol 63, pag 1390-1406.

R. Maxfield F. 802. Plasma membrane microdomains. *Current Opinion in cell Biology*. 14,483-487.

R. Oko and Maravei. 1994. Protein composition of theca of Bull Spermatozoa. *Biology of reproduction* 50,1000-1014.

Roselyne Rousseaux-Prévost, Christophe Lécuyer, Hervé Drobecq, Christian Sergheraert, Jean-Louis Dacheux & Jean Rousseaux. 2003. Characterization of Boar Sperm Cytoskeletal Cylicin II as an Actin-Binding Protein. *Biochemical and Biophysical Research*. 303: 182 – 189.

Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and assessment of their Post –Thawing. *Reproduction Fertility Developmental* 7, 871-91.

Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61. 481-492.

Witold k. Subczynski 2002. (Pulse EPR detection of membrane domains. *Current topics in biophysics*. 26(1), 59-64.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In Knobil E, Nelly JD, Swing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, editors. *The Physiology of reproduction Vol 1*. New Cork: Raven Press. Pp 190-302.